

6. Materialien und Methoden

6.1 Gel- und Elektrophoresebedingungen

Gel- und Laufpuffer:

10 X TBELOW:

0,89 M Tris, p.a. (Merck)	108 g
2 M Borsäure, p.a. (Merck)	123,86 g
0,02 M EDTA, p.a. (Merck)	7,3 g
pH 7,3	
auf einen Liter mit destilliertem Wasser auffüllen	

Elektrophoresebedingungen für die Messungen der durch unterschiedliche Membranen verursachten Änderung des fluoreszenten Untergrundes des Geles (6.2).

7 % Hydrolink Long Ranger (FMC)
1,2 X TBELOW
7 M Urea
1 hr entgasen
300 µl APS
50 µl TEMED
Gellänge: 30 cm
Geldicke: 0,35 mm
Geltemperatur: 45 °C
Leistung: 35 W
Spannung: 750 V
Stromstärke: 46mA
Integrationszeit: 2 s
Laufzeit 10 h

Elektrophoresebedingungen für die Versuche, die die 50 und 100 Nukleotide langen Oligomere einsetzen.

7 % Hydrolink Long Ranger (FMC)
0,6 X TBELOW
7 M Urea
1 hr entgasen
300 µl APS
50 µl TEMED
Gellänge: 60 cm
Geldicke: 0,3 mm
Geltemperatur: 45 °C
Leistung: 35 W
Spannung: 1300 V
Stromstärke: 27 mA
Integrationszeit: 2 s
Laufzeit 10 h

Gel- und Elektrophoresebedingungen der 60 cm langen Standardgele:

4,5 % Hydrolink Long Ranger (FMC)
1 X TBELOW
7 M Urea
1 hr entgasen
500 µl APS
50 µl TEMED
Gellänge: 60 cm
Geldicke: 0,3 mm
Geltemperatur: 45 °C
Leistung: 55 W
Spannung: 1450 V
Stromstärke: 38 mA
Integrationszeit: 4s
Laufzeit 20 h

6.2 Biologische Proben

Proben für Membranauswahl:

0,2 µl DNA Cy5 50mer (36 pmol/µl), 1/1000 verdünnt
0,5 µl DNA Cy5 100mer (19,9 pmol/µl), 1/1000 verdünnt
0,4 µl Thermostabiles Enzym (AmpliTaq FS, Perkin Pelmer)
0,75 µl 10X Sequenzierungspuffer
3 µl Terminationsmix
0,1 µl Stopplösung:
(100 % deonisiertes Formamid; 6 mg/ml Dextran Blau 2000; 20 mM
EDTA pH 8,3)

Cycle-Sequenzierungsprotokoll (4 Nukleotide separat)

pro Reaktion und Nukleotid

0,25 µl DNA (1µg/µl)
0,5 µl Cy5 Primer (2pmol/µl)
1 µl FITC Primer (2pmol/µl)
0,4 µl Thermostabiles Enzym (AmpliTaq FS, Perkin Pelmer)
0,75 µl 10X Sequenzierungspuffer
3 µl des jeweiligen Terminationsmixes (A, C, G oder T)
1,1 µl destilliertes Wasser

Cycling Programm : 35 mal (95 °C, 15 s \ 55 °C, 30 s \ 68 °C, 60 s)
MJR PTC-200 Thermocycler

0,5 µl Stopplösung:
(100 % deonisiertes Formamid; 6 mg/ml Dextran Blau 2000; 20 mM
EDTA pH 8,3)

Denaturierung: 86 °C, 2 min

Gesamtvolumen: 5,5 μ l

Eingesetzt: 2 μ l

10 X Sequenzierungspuffer:

(125 mM Tris-Cl, pH 9,5; 50 mM MgCl₂; 150 mM (NH₄)₂SO₄)

Optimierte Bedingungen für kleine Volumina pro Reaktion und Nukleotid

0,25 μ l DNA (1 μ g/ μ l)

0,5 μ l Cy5 Primer (2 pmol/ μ l)

1 μ l FITC Primer (2 pmol/ μ l)

0,4 μ l Thermostabiles Enzym (AmpliTaQ FS, Perkin Pelmer)

0,75 μ l 10 X Sequenzierungspuffer

3 μ l des jeweiligen Terminationsmixes (A, C, G oder T)

1,1 μ l destilliertes Wasser

Cycling Programm : 35mal (95 °C, 15 s \ 55 °C, 30 s \ 68 °C, 60 s)

MJR PTC-200 Thermocycler

1 μ l Stopplösung:

(50 % deonisiertes Formamid; 6 mg/ml Dextran Blau 2000; 20 mM EDTA pH 8,3)

Denaturierung: 86 °C, 18 min

Gesamtvolumen: 0,6 μ l

Eingesetzt: 0,2 μ l

6.3 Auswertungsprogramme

Das Programm "Tedit" als Basis der Auswertung der elektrophoretischen Auflösung

Die Auswertung der Halbwertsbreiten und der zeitlichen Abstände der Signale erfolgte mit dem am EMBL Heidelberg von Dr. Christian Schwager entwickelten Dateneditierungsprogramm "Tedit".

"Fragment Manager" zur Auswahl geeigneter Membranen mit fluoreszent markierten Oligonukleotiden

Zur Auswertung des integrierten fluoreszenten Signals wurde das von der Firma "Amersham Pharmacia" entwickelte Programm "Fragment Manager" verwendet. Dieses Programm findet nach Vorgabe geeigneter Parameter automatisch Signale. Die Untergrundreduktion erfolgt über die "Rolling Ball"-Methode. Das Prinzip ist, dass sich Bälle unterschiedlichen Radius' unter der Zeitachse fortbewegen. Ist der Radius eines Balles groß genug, wird er keine Signalwerte "schlucken" und zur Untergrundbestimmung verwendet. Danach wird das Signal integriert.

6.4 Membranen

Celluloseacetat	Hydrophil
Firma: Schleicher&Schuell	Porengröße: 0.45 µm
Typ 251/0	Ungeladen
	Dicke: 0.15 mm

Cellulosemischester	Hydrophil
Firma: Macherey-Nagel	Porengröße: 0.45 µm
Typ: CM (weiß)	Ungeladen
	Dicke: 0.18 mm

Cellulosemischester	Hydrophil
Firma: Macherey-Nagel	Porengröße: 0.45 µm
Typ: MV (weiß)	Ungeladen
Unterstützt mit Polyester- vlies	Dicke: 0.18 mm

Cellulosenitrat	Hydrophil
Firma: Schleicher&Schuell	Porengröße: 0.45 µm
Typ: Optitran BA-S85	Ungeladen
	Dicke: 0.16 mm

Cellulosenitrat	Hydrophil
Firma: Schleicher&Schuell	Porengröße: 0.45 µm
Typ: BA85	Ungeladen
Auf Polyaethylenterephthalat	Dicke: 0.33 mm

Filtrierpapier	hydrophil/hydrophob
Firma: Schleicher&Schuell	Dicke: 0.30 mm
Typ: 335976	
Filtrierpapier/Polyethylen	

Filtrierpapier	Hydrophil
Firma: Macherey & Nagel	Dicke: 0.31 mm
Typ: MN214	

Glasfaser	Hydrophil
Firma: Sartorius	Dicke: 0.3 mm
Bestellnr.: 13430-25-M	

Glasfaser	Hydrophil
Firma: Schleicher&Schuell	Dicke: 0.34 mm
Typ: GF52	
auf Polyaethylenterephthalat	

Kongorotpapier	Hydrophil
Firma: Schleicher&Schuell	Dicke: 0.22 mm
Bestellnr.: 10 360 500	

Nylon 6.6	hydrophil
Firma: Pall	Porengröße: 0.45 μm
Typ: Biodyne B	positiv geladen
Unterstützt mit Polyester- vlies	Dicke: 0.17 mm

Nylon 6.6	Hydrophil
Firma: Pall	Porengröße: 0.45 μm
Typ: Biodyne A	Amphoter
Unterstützt mit Polyester- vlies	Dicke: 0.15 mm

Nylon 6.6	Hydrophil
Firma: Pall	Porengröße: 0.45 μm

Typ: Ultipor NX	Amphoter
Nicht unterstützt	Dicke: 0.17 mm

Nylon	Hydrophil
Firma: Schleicher&Schuell	Porengröße: 0.45 μm
Typ: Super Charge	positive geladen
	Dicke: 0.18 mm

Nylon 6.6	Hydrophil
Firma: Pall	Porengröße: 0.45 μm
Typ: Biodyne C	negativ geladen
unterstützt mit Polyester- vlies	Dicke: 0.16 mm

Nylon 6.6	Hydrophil
Firma: Roche	Porengröße: 0.45 μm
	Ungeladen
unterstützt mit Polyester- vlies	Dicke: 0.16 mm

Polyester	Hydrophil
Firma: Macherey&Nagel	Porengröße: 0.45 μm
Typ: PE	Dicke: 0.1 mm

Polyester	Hydrophil
Firma: Seitz	Porengröße: 0.2 μm
Typ: BTS-45 (shiny)	Dicke: 0.2 mm

Polysulfone	Hydrophil
Firma: Pall	Porengröße: 0.45 μm
Typ: HT Tuffrin	Ungeladen
	Dicke: 0.16 mm

Polyethersulfone (PES)	Hydrophil
Firma: Pall	Porengöße: 0.45 µm
	Ungeladen
	Dicke: 0.17 mm

Polytetrafluorethylen (PTFE)	Hydrophob
Firma: Macherey&Nagel	Porengröße: 0.45 µm
Typ: TE	Dicke: 0.2 mm

Polyvinylidendifluorid (PVDF)	einmalig hydrophil
Firma: Pall	Dicke: 0.16 mm
Typ: Aquarius P	

6.4 Messgeräte

Leitfähigkeitsmessgerät

Zur Messung der elektrischen Leitfähigkeit wurde das Leitfähigkeitsmessgerät HI 8733 der Firma Hanna Instruments Limited eingesetzt. Der Messbereich liegt zwischen 0 und 199,9 mS/cm. Die Messungen wurden bei 25° C durchgeführt.

Multimeter

Zur Messung der elektrischen Widerstände wurde das Digitalmultimeter ME-32 der Firma "Conrad" eingesetzt. Der Messbereich liegt zwischen 400 Ohm (+/- 0,5%) und 40 MOhm (+/- 0,5%). Die Messungen wurden bei 25° C durchgeführt.